

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Kateřina Glässnerová**

Vegetativní inkompatibilita u vláknitých askomycetů  
Vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: MUDr. Mgr. Vít Hubka, Ph.D.

Praha 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 5. 2019

.....  
Kateřina Glässnerová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala mému školiteli MUDr. Mgr. Vítu Hubkovi, Ph.D. za cenné připomínky, trpělivost a pomoc při vedení práce. Velký dík patří i mé rodině a blízkým za podporu nejen při zpracování bakalářské práce.

## Abstrakt

Vegetativní inkompatibilita je proces vyskytující se během vegetativního růstu u vláknitých hub, který může zabránit fúzi hyf mezi jedinci. Při splynutí hyf dvou jedinců s geneticky nekompatibilní kombinací alel genů vegetativní inkompatibility (např. genů *het* nebo *vic*) dojde k destrukci vzniklé heterokaryotické buňky programovanou buněčnou smrtí, která může být zprostředkována různými způsoby. Funkcí tohoto mechanismu může být zachování genetické individuality jedince či zabránění přenosu škodlivých cytoplazmatických elementů (např. mykovirů). Zkoumání genů spojených s vegetativní inkompatibilitou hraje významnou roli např. při indukci pohlavního stadia *in vitro* nebo při studiu mechanismů speciace u hub. Na molekulárně genetické úrovni byla vegetativní inkompatibilita detailně popsána zatím jen u tří druhů askomycetů. Cílem této práce je shrnout doposud známé poznatky o významu vegetativní inkompatibility a genetických mechanismech, kterými je tento proces zajištěn.

**Klíčová slova:** vegetativní inkompatibilita, *het* geny, *vic* geny, *mat* lokus, programovaná buněčná smrt, *Neurospora crassa*, *Podospora anserina*, *Cryphonectria parasitica*

## Abstract

Vegetative incompatibility is a process occurring during vegetative growth in filamentous fungi which can prevent fusion of hyphae between individuals. In case of hyphal fusion between two individuals with genetically incompatible combination of alleles of vegetative incompatibility genes (i.e. *het* or *vic* genes), the newly-emerged heterokaryotic cell is destroyed via programmed cell death, which can be mediated in various ways. The purpose of this mechanism can be to preserve the genetic individuality of an individual or to prevent the transmission of a deleterious cytoplasmatic elements (e.g. mycoviruses). Exploring the vegetative incompatibility genes plays an important role for example in the induction of sexual state *in vitro* or in the study of speciation mechanisms in fungi. On the molecular-genetic level, vegetative incompatibility has been so far described in detail only in three ascomycete species. This thesis aims to summarize our knowledge concerning the significance of vegetative incompatibility and genetical mechanisms that underlie this process.

**Key words:** vegetative incompatibility, *het* genes, *vic* genes, *mat* locus, programmed cell death, *Neurospora crassa*, *Podospora anserina*, *Cryphonectria parasitica*

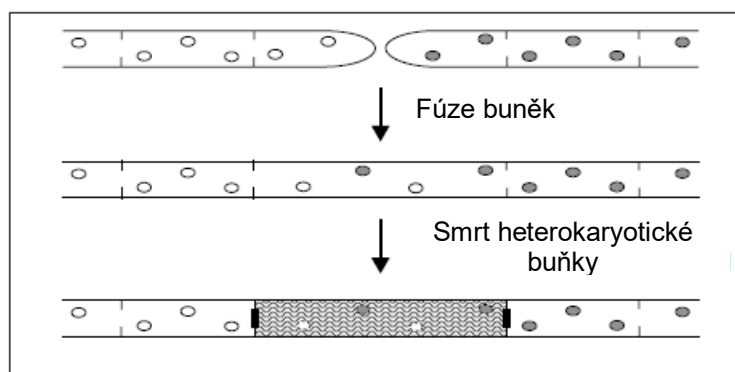
## Obsah

1. Úvod .....	1
1.1. Systémy vegetativní inkompatibility .....	2
2. Význam vegetativní inkompatibility .....	3
2.1. Funkční a evoluční význam vegetativní inkompatibility .....	3
2.2. Praktický význam zkoumání vegetativní inkompatibility .....	4
3. Vegetativní inkompatibility u <i>Neurospora crassa</i> .....	6
3.1. <i>het-c</i> lokus .....	6
3.2. <i>het-6</i> lokus .....	9
3.3. <i>mat</i> lokus <i>Neurospora crassa</i> .....	11
4. Vegetativní inkompatibility u <i>Podospora anserina</i> .....	12
4.1. Alelický systém <i>het-s/het-S</i> .....	12
4.2. Nealelické systémy .....	14
4.2.1. <i>het-c/het-e</i> a <i>het-c/het-d</i> systém .....	15
4.2.2. <i>het-r/het-v</i> systém .....	16
4.2.3. Role genů <i>idi</i> a <i>mod</i> v systémech vegetativní inkompatibility .....	17
5. Vegetativní inkompatibility u <i>Cryphonectria parasitica</i> .....	18
5.1. <i>vic</i> geny .....	18
6. Závěr .....	22
7. Seznam použité literatury .....	24

# 1. Úvod

Většina organismů si během evoluce vyvinula různě komplikované mechanismy pro vzájemné rozpoznávání jedinců stejného či odlišného druhu na buněčné úrovni. U obratlovců tuto funkci plní MHC komplex (z anglického „major histocompatibility complex“) (Jones *et al.* 1998), u rostlin tzv. S lokus SI systému (z anglického „self-incompatibility“) zabráňující samooplození (Nasrallah 2002) a u hub má tuto funkci systém označovaný jako vegetativní inkompatibilita (Saupe 2000). Vegetativní inkompatibilita (jinými slovy heterokaryonová inkompatibilita) je proces vyskytující se mezi askomycety i bazidiomycety a zahrnuje vzájemné rozpoznávání jedinců stejného nebo odlišného druhu hub či rozpoznání sebe sama. Alely genů spojených s rozpoznáváním často vykazují mezidruhové polymorfismy, které jsou v populaci udržovány jako vyvážené polymorfismy (Wu *et al.* 2002; Klein *et al.* 2002).

Během vegetativního růstu tvoří vláknité houby síť mnohojaderných vláken (mycelium), která mohou volně splývat v rámci jedince či s vlákny odlišných jedinců. Po vzájemném rozpoznání a fúzi vegetativních buněk hyf dvou jedinců vznikne heterokaryotická buňka obsahující dvě geneticky odlišná jádra. U geneticky nekompatibilních jedinců dochází k zastavení růstu, inhibici sporulace, vytvoření sept, vakuolizaci a programované buněčné smrti heterokaryotické buňky (Obr. 1). (Saupe *et al.* 2000; Glass a Dementhon 2006).

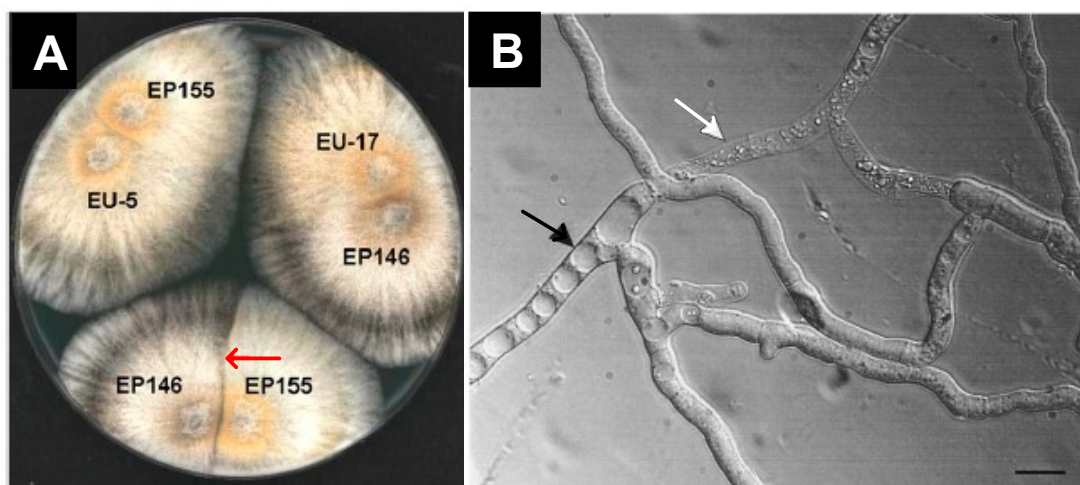


**Obr. 1.** Reakce vegetativní inkompatibility. Dvě hyfy geneticky odlišných jedinců splynou, heterokaryotická buňka je následně zničena programovanou buněčnou smrtí a oddělena septy, která brání šíření letální reakce do sousedních buněk. Převzato a upraveno podle Saupe *et al.* (2000).

Tento jev pozorujeme, když dojde ve stejné cytoplazmě ke koexpresi nekompatibilních alel genů vegetativní inkompatibility. Typickým příkladem jsou alely lokusů *het* nebo *vic*

(odvozeno z anglického „heterokaryon incompatibility“ a „vegetative incompatibility“). Počet *het* lokusů se liší mezi jednotlivými druhy (Saupe *et al.* 2000; Paoletti 2016).

Vegetativní inkompatibilita může být pozorována na makroskopické i mikroskopické úrovni (Aanen *et al.* 2010). Po naočkování dvou nekompatibilních kmenů na kultivační plotnu s médiem můžeme proces vegetativní inkompatibility na makroskopické úrovni pozorovat jako viditelnou hraniční linii (nazývanou „barrage“) mezi jednotlivými nekompatibilními kmeny (Obr. 2-A) (Saupe 2000). U některých druhů bazidiomycetů může být tato linie pozorovatelná i na dřevě v přírodě (Worrall 2007). Na mikroskopické úrovni může být vegetativní inkompatibilita pozorovatelná jako kompartmentace hyf, vakuolizace a buněčná smrt (Obr. 2-B).



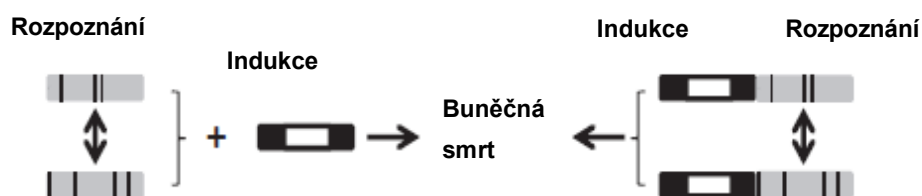
**Obr. 2.** Makroskopicky a mikroskopicky viditelná reakce vegetativní inkompatibility. **A:** Naočkované kmeny *Cryphonectria parasitica*, které se liší v alele lokusu *vic*. Červená šipka ukazuje na hraniční linii („barrage“) vytvořenou mezi nekompatibilními kmeny. Převzato a upraveno podle Choi *et al.* (2012). **B:** SI (z anglického „self-incompatible“) kmeny *Podospora anserina* s kombinací nekompatibilních alel *het-C* a *het-E*. Černá šipka směřuje k výrazně zvětšeným vakuolám a bílá šipka ke kompletně zničeným mrtvým buňkám. Převzato a upraveno podle Saupe (2000).

## 1.1. Systémy vegetativní inkompatibility

U vegetativní inkompatibility rozlišujeme systémy alelické, kdy dochází ke koexpresi geneticky nekompatibilních alel jednoho genu, nebo systémy nealelické, kdy dochází ke koexpresi geneticky nekompatibilních alel různých genů (Saupe 2000). Proces rozpoznávání při vegetativní inkompatibilitě se děje pomocí dvou specifických proteinových oblastí, které se mohou nacházet společně na jednom proteinu nebo mohou být každá na jiném proteinu (Obr. 3) (Paoletti 2016). První oblast zahrnuje vysoce polymorfní doménu důležitou pro

rozpoznání druhého jedince. Rozpoznání jedince stejného či odlišného druhu bývá zprostředkováno interakcemi proteinů kódovaných alelami systémů vegetativní inkompability (Glass a Dementhon 2006; Kaneko *et al.* 2006). Druhá oblast zahrnuje doménu důležitou pro aktivaci programované buněčné smrti. Příkladem takové složky jsou proteiny s HET doménou (Paoletti 2016), které jsou v genomech vláknitých askomycetů časté (Fedorova *et al.* 2005). Téměř u všech popsanych systémů vegetativní inkompability zahrnujících *het* lokus je protein s HET doménou přítomen (Glass a Dementhon 2006). HET doména je charakterizována třemi konzervovanými aminokyselinovými úseky v oblasti velké přibližně 200 aminokyselin (Smith *et al.* 2000).

Na molekulárně-genetické úrovni byla vegetativní inkompabilita detailně prozkoumána zatím jen u tří druhů askomycetů, konkrétně u *Neurospora crassa*, *Podospora anserina* a *Cryphonectria parasitica* (Paoletti 2016). U bazidiomycetů sice byly objeveny lokusy zapojené ve vegetativní inkompabilitě, ale genetické mechanismy zatím nebyly objasněny (Worrall 2007). Genetická kontrola vegetativní inkompability se pravděpodobně liší mezi askomycety a basidiomycety. Většina askomycetů je během vegetativního růstu homokaryotická a vegetativní inkompabilita funguje jako mechanismus, který brání koexistenci dvou geneticky odlišných jader v jedné buňce, kdežto u bazidiomycetů je běžná dlouhá dikaryotická fáze životního cyklu (Saenz *et al.* 2001).



**Obr. 3.** Systémy vegetativní inkompability zahrnují složku pro rozpoznávání (šedý oddíl) vykazující vysokou úroveň polymorfismu (černé vertikální čáry) a složku pro indukci programované buněčné smrti (černý oddíl). Součástí druhé složky bývá často protein s HET doménou (bílý obdélník). Tyto dvě složky se mohou vyskytovat společně na jednom proteinu nebo každá může být na jiném proteinu. Převzato a upraveno podle Paoletti (2016).

## 2. Význam vegetativní inkompability

### 2.1. Funkční a evoluční význam vegetativní inkompability

Ohledně funkčního a evolučního významu vegetativní inkompability existují dvě hypotézy. První hypotéza říká, že funkcí genů vegetativní inkompability je zachování genetické individuality jedince rozeznáváním jedinců vlastního či odlišného druhu a zamezením



vzniku heterokaryotické buňky mezi nimi. Druhá hypotéza říká, že vegetativní inkompatibilita mohla vzniknout náhodným evolučním procesem a nemusí mít žádnou biologickou funkci. Tato hypotéza vychází z teorie, že v populaci existují určité alelické kombinace, a některé z těchto kombinací mohou být při výskytu ve stejné cytoplazmě heterokaryotické buňky škodlivé (Saupe 2000).

Zabránění vzniku heterokaryotické buňky při vegetativní inkompatibilitě může mít několik výhod. Jednou z nich je zamezení horizontálnímu šíření škodlivých cytoplazmatických elementů, jako například mykovirů (viz kapitola 5.), plazmidů nebo mobilních genetických elementů (tj. transpozonů apod.) (Saupe 2000). Je zajímavé, že schopnost zamezit šíření škodlivých cytoplazmatických elementů ve může lišit podle toho, v kolika *het* lokusech se dva jedinci liší. U druhu *Aspergillus amstelodami* (dnes *A. montevidensis*) byl mezi vegetativně kompatibilními a nekompatibilními jedinci zkoumán přenos infekční cytoplazmy způsobující buněčnou smrt. U vegetativně kompatibilních jedinců došlo k přenosu cytoplazmy ve 100 % případů, kdežto u vegetativně nekompatibilních zástupců byl přenos redukován jen na 15 %. Když se nekompatibilní jedinci lišili pouze v jednom *het* lokusu, byl přenos částečně umožněn. U kmenů lišících se ve dvou a více *het* lokusech bylo přenosu infekční cytoplazmy zamezeno (Caten 1972). Vegetativní inkompatibilita také může fungovat jako proces zabraňující tzv. jadernému parazitismu, kdy jádra konidií po dopadnutí na kmen mateřského jedince, se kterým jsou vegetativně kompatibilní, mohou vykořistit zdroje potřebné pro vytvoření plodnice a využívat je pro vytvoření vlastních plodnic (Debets a Griffiths 1998).

Vegetativní inkompatibilita ale může být v některých případech limitující. Je známo, že u některých hub může probíhat různě intenzivní parasexuální cyklus. Tento proces je důležitý u asexuálních druhů hub, protože díky němu může po fúzi vegetativních hyf dojít k rekombinaci a ke vzniku genetické variability (Pontecorvo 2003). Vegetativní inkompatibilita může tento proces značně limitovat (Paoletti 2016). Bastiaans *et al.* (2015) zjistili, že fúze hyf mezi jedinci u *N. crassa* může mít příznivý vliv pro její další vývoj, jelikož díky ní může dojít například ke zvětšení kolonie. Vegetativní inkompatibilita ale snížila možnost takové kooperace mezi jedinci.

## **2.2. Praktický význam zkoumání vegetativní inkompatibility**

Vegetativní inkompatibilita hraje významnou roli při fúzi hyf dvou jedinců. Aby fúze hyf proběhla, nesmí v jedné cytoplazmě dojít ke koexpresi geneticky nekompatibilních alel genů

vegetativní inkompatibiliti. Pomocí vegetativní inkompatibiliti můžeme kmeny jednotlivých druhů rozdělit do tzv. VCG skupin (z anglického „vegetative compatibility groups“) (Aanen *et al.* 2010). Kmeny stejné VCG skupiny mohou mezi sebou tvořit anastomózy a následně u nich po vzniku heterokaryotické buňky může docházet k parasexuálnímu cyklu (proces, kdy po fúzi hyf dojde ke splynutí dvou odlišných haploidních jader za vzniku diploidního jádra a následné rekombinaci (Pontecorvo 2003). Díky fúzi hyf a následnému pohlavnímu či parasexuálnímu cyklu může docházet k předávání funkčně důležitých genů, např. genů virulence, genů rezistence proti fungicidům, antimykotikům apod. (Kwon-Chung a Sugui 2009; Swilaiman *et al.* 2013).

K pohlavnímu rozmnožování jsou zapotřebí kompatibilní pohlavní geny *mat* (nebo také MAT geny; z anglického „mating type genes“) a správná kombinace alel genů vegetativní inkompatibiliti. Díky dnes dobře známým vlastnostem *mat* genů se podařilo u zdánlivě asexuálních druhů hub navodit pohlavní stadium cílenými křížícími experimenty opačně laděných kmenů stejného druhu (Dyer a O’Gorman 2011). I přes rozsáhlé znalosti o *mat* genech se pohlavní stadium u některých druhů nedaří navodit, nebo se daří křížit jen některé opačně laděné izoláty. Příkladem mohou být zástupci druhového komplexu *Aspergillus viridinutans*, kde u některých druhů nedochází ke křížení u vysokého počtu opačně laděných izolátů stejného druhu (Hubka *et al.* 2018). Je pravděpodobné, že v tomto případě geny vegetativní inkompatibiliti mohou vysvětlit významnou část těchto neúspěšných křížících pokusů.

Vegetativní inkompatibilita hrála pravděpodobně důležitou roli ve speciaci, kdy se spolu s dalšími geny pravděpodobně podílí na udržení druhových hranic a zabránění hybridizaci mezi odlišnými biologickými druhy. Přesto však k mezidruhovému křížení může docházet volně v přírodě, např. u *Ophiostoma ulmi* (Brasier *et al.* 1998), nebo je možné hybridizaci u některých druhů navodit v laboratorních podmínkách, např. u *N. crassa* (Dettman *et al.* 2003). Většina mezidruhových křížení v laboratorních podmínkách je zpravidla neúspěšná, pravděpodobně z důvodu vytvoření silné reprodukční bariéry mezi jednotlivými druhy. Některé opačně laděné izoláty odlišných druhů ale ochotně vytváří hybridy s jinými druhy, jak bylo ukázáno např. u zástupců druhového komplexu *Aspergillus viridinutans*, (Hubka *et al.* 2018). Role genů vegetativní inkompatibiliti v těchto případech ale zůstává neobjasněna.

Reprodukční bariéry dělíme na pre-zygotické a post-zygotické. Pre-zygotické bariéry zamezují hybridizaci ještě předtím, než dojde ke splynutí gamet. Mezi ně řadíme například

pohlavní inkompatibilitu, která je zajištěna tzv. *mat* geny, které kontrolují, aby docházelo ke spárování opačně pohlavně laděných jedinců. Další pre-zygotickou reprodukční bariérou může být právě vegetativní inkompatibilita, která je zajištěna geny *het* a *vic*. Post-zygotické reprodukční bariéry se projevují až po splynutí gamet a jedná se např. o sterilitu hybridů, vývojové vady hybridů apod. (Turner *et al.* 2010). Ve výjimečných případech může vegetativní inkompatibilita fungovat jako post-zygotická bariéra, což je podrobněji vysvětleno v kapitole 4.2.

### 3. Vegetativní inkompatibilita u *Neurospora crassa*

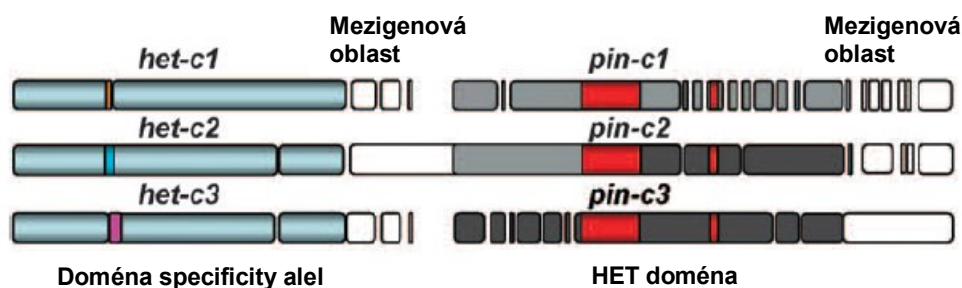
U *Neurospora crassa* bylo objeveno 11 *het* lokusů. Na molekulární úrovni byly charakterizovány lokusy *het-6*, *het-c* a *mat* (Saupe 2000). U lokusů *het-c* a *het-6* je vegetativní inkompatibilita způsobena nealelickými interakcemi mezi alelami blízce vázaných genů *het-c/pin-c* a *het-6/un-24*.

#### 3.1. *het-c* lokus

Lokus *het-c* u *N. crassa* kóduje protein o velikosti přibližně 960 aminokyselin a existuje ve třech různých alelických formách *het-c<sup>OR</sup>*, *het-c<sup>PA</sup>* a *het-c<sup>GR</sup>*. Jednotlivé alely *het-c* se liší krátkou oblastí s inzercemi/delecemi, která odpovídá zhruba 30–48 aminokyselinám u polypeptidů HET-C<sup>OR</sup>, HET-C<sup>PA</sup> a HET-C<sup>GR</sup>. Kromě této krátké oblasti jsou si tyto proteiny velikostně i strukturně podobné. HET-C protein se nachází v plazmatické membráně a skládá se ze dvou transmembránových domén, N-konce se signálním peptidem (důležitým pro lokalizaci komplexu v plazmatické membráně), a C-konce s doménou bohatou na glycin, která vyčnívá ven z buňky (Saupe *et al.* 1996a). Pokud se v jedné cytoplazmě setkají dva odlišné HET-C proteiny (kódovány *het-c* alelami odlišného typu), dochází k tvorbě proteinového heterokomplexu a k typickým projevům vegetativní inkompatibility (Saupe a Glass 1997; Sarkar *et al.* 2002). Přítomnost heterokomplexu HET-C v plazmatické membráně se poté fenotypově projevuje zastavením růstu, inhibicí sporulace, kompartmentací hyf a buněčnou smrtí. Tyto projevy mohou být způsobeny jednak změnami v plazmatické membráně a destabilizací hyfy v důsledku lokalizace heterokomplexu HET-C, nebo formace heterokomplexu HET-C může působit jako spouštěč dráhy vedoucí k těmto fenotypovým projevům. Heterokomplex HET-C se jeví stabilnější než samotné proteiny

HET-C<sup>OR</sup>, HET-C<sup>PA</sup> a HET-C<sup>GR</sup>, pravděpodobně z důvodu konformačních změn těchto proteinů při tvorbě heterokomplexu nebo z důvodu zamaskování vazebných míst pro proteázy jinými proteiny (Sarkar *et al.* 2002).

Pro rozpoznání odlišných jedinců jsou u *N. crassa* zásadní synergistické interakce mezi alelami lokusu *het-c* a *pin-c* (odvozeno z anglického „partner for incompatibility with *het-c*“). Jelikož se jednotlivé alely *het-c* a *pin-c* nachází na jiných lokusech, jde o tzv. interakce nealelické. Za rozpoznání jiných jedinců a navození vegetativní inkompatibility jsou u *N. crassa* zodpovědné nejen nealelické interakce mezi alelami *het-c* a *pin-c*, ale také alelické interakce lokusu *het-c*, které zvyšují intenzitu fenotypového projevu vegetativní inkompatibility. *pin-c* je lokus blízce vázaný k lokusu *het-c* a kóduje proteiny s HET doménou (Obr. 4). Alely *pin-c1*, *pin-c2* a *pin-c3* jsou vysoce polymorfní a při porovnání mezi sebou vykazovaly více než 60% identitu nukleotidů. Alela *pin-c2* pravděpodobně vznikla rekombinací v rámci HET domén mezi *pin-c1* a *pin-c3*, což dokazuje podobnost *pin-c2* s *pin-c3* v HET doméně a C-koncové oblasti, a podobnosti *pin-c2* a *pin-c1* v N-koncové oblasti. Oblast HET domény u všech tří alel (*pin-c1*, *pin-c2* a *pin-c3*) je vysoce konzervovaná (Kaneko *et al.* 2006).

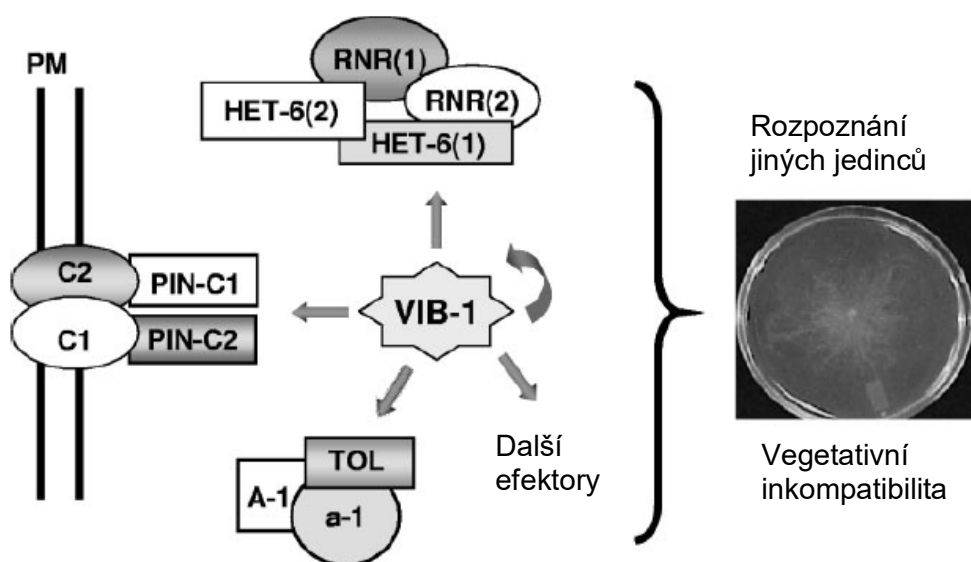


**Obr. 4.** Haplotypy *het-c1/pin-c1*, *het-c2/pin-c2*, *het-c3/pin-c3*. Doména specifity alel *het-c* je znázorněna odlišnými barvami. Konzervovaná sekvence *het-c* je znázorněna modře. Oblasti s indely v sekvenci jednotlivých alel *pin-c* jsou znázorněny mezerami. Vysoce konzervovaná HET doména alel *pin-c* je znázorněna červeně. Černé a šedé oblasti značí polymorfismus v sekvenci *pin-c* mimo oblast HET domény. Podobnost alel *pin-c1* a *pin-c2* je viditelná v oblasti 5' konce (šedá oblast) a alel *pin-c2* a *pin-c3* v oblasti 3' konce (černá oblast). Převzato a upraveno podle Kaneko *et al.* (2006).

Kaneko *et al.* (2006) předpokládají, že většina systémů vegetativní inkompatibility, zahrnující *het* lokusy u vláknitých askomycet, potřebuje pro rozpoznání jiných jedinců nealelické interakce mezi genem s HET doménou a dalším genem, jehož funkce se mohou lišit. Proteiny s HET doménou jsou kromě vlastní HET domény odlišné, složené z dalších domén, například NACHT domény (regulační, NTP vazebná doména), vyskytující se u

několika proteinů zahrnutých v procesu programované buněčné smrti (Leipe *et al.* 2004)) nebo proteinkinázové domény.

U *N. crassa* byl dále popsán lokus *vib-1* (z anglického „vegetative incompatibly blocked“), který je zásadní pro expresi genů v lokusech *het-6*, *pin-c* a *tol* (Xiang a Glass 2002; Dementhon *et al.* 2006). Proteiny kódované geny *het-6*, *pin-c* a *tol* obsahují HET doménu, která je důležitá pro zprostředkování reakce programované buněčné smrti při procesu vegetativní inkompatibility. *vib-1* kóduje protein VIB-1 který je složený z 670 aminokyselin a nachází se v jádře (Xiang a Glass 2002). Je zásadním regulátorem transkripce během vegetativního růstu a vegetativní inkompatibility (Dementhon *et al.* 2006). Mutace ve *vib-1* potlačují vegetativní inkompatibilitu způsobenou genetickými rozdíly u systémů *het-c/pin-c*, *mat*, a u *un-24/het-6* *N. crassa* (Obr. 5). Kromě funkcí spojených s vegetativní inkompatibilitou a expresí *het-6*, *pin-c* a *tol* je přítomnost *vib-1* zásadní pro několik dalších funkcí, např. pro produkci extracelulárních proteáz potřebných při nedostatku dusíku a uhlíku. Mutanti v genu *vib-1* mají problémy s růstem hyf a atypicky sporulují, což naznačuje, že VIB-1 hraje významnou roli při procesu sporulace (Dementhon *et al.* 2006).



**Obr. 5.** Model vzájemného rozpoznávání jedinců a vegetativní inkompatibility zprostředkované genetickými rozdíly u *het-c/pin-c*, *mat*, *het-6/un-24*. VIB-1 je zásadní pro expresi genů v lokusech *het-6*, *pin-c*, *tol*, a pro další efekty spojené s vegetativní inkompatibilitou. Převzato a upraveno podle Dementhon *et al.* (2006).

Pomocí značení GFP (z anglického „green fluorescent protein“) bylo zjištěno, že se lokalizace VIB-1 mění v průběhu vegetativního růstu i v průběhu reakce vegetativní inkompability. Během vegetativního růstu se VIB-1 nachází v jádrech vegetativních hyf. V konidioforech a nezralých konidiích se VIB-1 nachází v cytoplazmě, ale u zralých konidií je VIB-1 opět lokalizován v jádře. Odlišná lokalizace VIB-1 ve vegetativních hyfách, konidioforech a konidiích může být důležitá pro správnou regulaci sporulace při nepohlavním rozmnožování. V průběhu vegetativní inkompability byla pozorována zvýšená jaderná fluorescence VIB-1 v místech, které obklopovaly odumírající hyfové kompartmenty. Po chvíli tato místa se zvýšenou fluorescencí začala odumírat také. Pravděpodobně tedy dochází k přenosu signálu z částí, které odumírají v důsledku vegetativní inkompability, do sousedních hyfových kompartmentů, kde se zvýší jaderná lokalizace VIB-1 a následně dojde k odumření těchto kompartmentů (Dementhon *et al.* 2006).

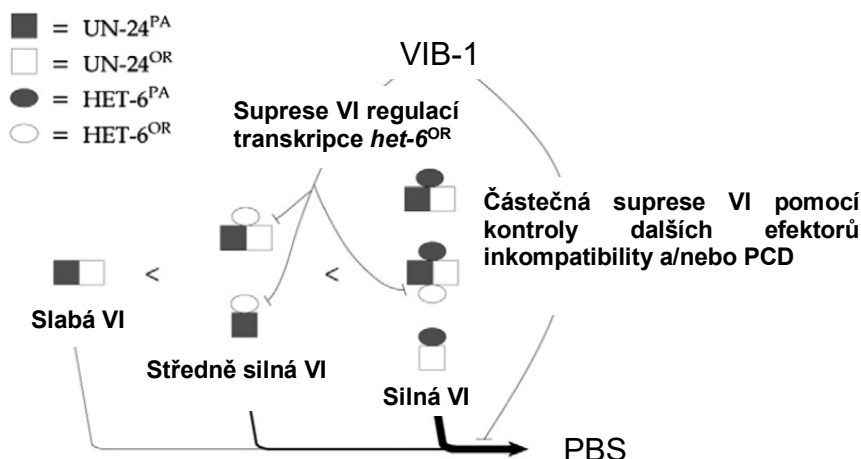
### 3.2. *het-6* lokus

Dalším *het* lokusem u *N. crassa* je *het-6*, který kóduje protein s HET doménou, a zahrnuje dva blízce vázané geny *het-6* a *un-24* (Smith *et al.* 2000). Oba tyto geny existují ve dvou alelických formách (*het-6<sup>OR</sup>* a *het-6<sup>PA</sup>*; *un-24<sup>OR</sup>* a *un-24<sup>PA</sup>*) a jsou ve vazebné nerovnováze. V přírodě se vyskytují pouze jedinci *het-6<sup>OR</sup>/un-24<sup>OR</sup>* (OR haplotyp) nebo *het-6<sup>PA</sup> / un-24<sup>PA</sup>* (PA haplotyp). Rekombinantní formy (například *het-6<sup>OR</sup> / un-24<sup>PA</sup>* se v přírodě nevyskytují, protože mezi formami OR a PA nedochází k rekombinaci z důvodu paracentrické inverze (typ chromozomové aberace, kdy dojde na jednom chromozomu ke dvěma zlomům v oblasti mimo centromeru a úsek mezi zlomy se převrátí o 180°) (Micali a Smith 2006). DNA alel *het-6<sup>OR</sup>* a *het-6<sup>PA</sup>* je identická ze 78 % a sekvence polypeptidů je identická ze 68 % (Smith *et al.* 2000). Oba tyto polypeptidy obsahují tři aminokyselinové úseky sekvencí, které byly nalezeny i u proteinů spojených s vegetativní inkompabilitou HET-E u *P. anserina* (Saupe *et al.* 1995) a TOL u *N. crassa* (Shiu a Glass 1999). *un-24* kóduje velkou podjednotku enzymu ribonukleotid-reduktázy typu I, jehož funkcí je konvertovat ribonukleotidy na deoxyribonukleotidy nezbytné pro syntézu a opravu DNA (Jordan a Reichard 1998). C-konec proteinu kódovaného *un-24* se liší mezi alelami *un-24<sup>OR</sup>* a *un-24<sup>PA</sup>* (Smith *et al.* 2000).

Vegetativní inkompabilita u lokusu *het-6* je zprostředkována interakcemi proteinů kódovaných alelami, které jsou v procesu inkompability zahrnuty (Lafontaine a Smith

2012). Micali a Smith (2006) vytvořili kmeny s novými alelickými kombinacemi *het-6<sup>OR</sup>* / *un-24<sup>PA</sup>* a *het-6<sup>PA</sup>* / *un-24<sup>OR</sup>* a zjistili, že oproti přirozeně se vyskytujícím kmenům mají nižší fitness (produkují méně životaschopných askospor). Dále provedli transformační pokusy s kmeny odlišných haplotypů a zjistili, že výsledky interakcí se liší. Když zavedli alelu *het-6<sup>PA</sup>* nebo *un-24<sup>PA</sup>* do kmene s OR haplotypem, nedošlo k inkompatibilitě a transformanti byli životaschopní. V opačném případě, to znamená při zavedení alely *het-6<sup>OR</sup>* nebo *un-24<sup>OR</sup>* do kmene s PA haplotypem, došlo k inkompatibilitě a zastavení růstu transformantů. Za vegetativní inkompatibilitu jsou u lokusu *het-6* u *N. crassa* zodpovědné alelické interakce mezi *un-24<sup>OR</sup>/un-24<sup>PA</sup>*; a nealelické interakce mezi *het-6<sup>OR</sup>/un-24<sup>PA</sup>* a *het-6<sup>PA</sup>/un-24<sup>OR</sup>* (Lafontaine a Smith 2012). Byly pozorovány disproporce v intenzitě vegetativní inkompatibility podle toho, které alely spolu při vegetativní inkompatibilitě interagovaly (Obr. 6). Alelické interakce mezi *un-24<sup>OR</sup>/un-24<sup>PA</sup>* vykazovaly mírné projevy vegetativní inkompatibility. Naproti tomu interakcí komplexu *un-24<sup>OR</sup>/un-24<sup>PA</sup>* s alelami *het-6<sup>OR</sup>* nebo *het-6<sup>PA</sup>* se míra projevů vegetativní inkompatibility začala zvyšovat.

Jak bylo zmíněno výše, *vib-1* je gen, který je důležitý pro expresi *het-6* u *N. crassa* (Obr. 5) (Dementhon *et al.* 2006). Regulace transkripce *het-6<sup>OR</sup>* a *het-6<sup>PA</sup>* pomocí VIB-1 se výrazně liší, a potlačení vegetativní inkompatibility *het-6* lokusu může být způsobeno snížením transkripce *het-6<sup>OR</sup>* (Obr. 6) (Lafontaine a Smith 2012).



**Obr. 6.** Vegetativní inkompatibilita („VI“) u *Neurospora crassa*: schéma interakcí alel lokusů *het-6* a *un-24* a její suprese pomocí *vib-1*. Model znázorňuje, že k vegetativní inkompatibilitě dochází pomocí interakcí mezi proteiny. Dochází jednak k nealelickým nekompatibilním interakcím mezi *un-24<sup>PA</sup>/het-6<sup>OR</sup>* a *un-24<sup>OR</sup>/het-6<sup>PA</sup>*, ale také k alelickým interakcím, kde je mírná inkompatibilita spojena s heteroalelismem *un-24* (*un-24<sup>PA</sup>/un-24<sup>OR</sup>*; vlevo), která může být zesílena interakcí s *het-6*. Interakcí s alelou *het-6<sup>PA</sup>* (vpravo) je vyvolána silnější inkompatibilita než s *het-6<sup>OR</sup>* (uprostřed). *vib-1* kompletně potlačuje inkompatibilitu spojenou s *het-6<sup>OR</sup>*, pravděpodobně snížením transkripce *het-6<sup>OR</sup>*. Částečné potlačení vegetativní inkompatibility pomocí *vib-1* je pravděpodobně regulováno cestou dalších faktorů přispívajících k vegetativní inkompatibilitě a PBS (programované buněčné smrti). Převzato a upraveno podle Lafontaine a Smith (2012).

### 3.3. *mat* lokus *Neurospora crassa*

Dalším lokusem, který u *N. crassa* zprostředkovává vegetativní inkompatibilitu, je tzv. mating-type locus *mat*. Kromě úlohy zprostředkování vegetativní inkompatibility během vegetativního růstu hraje významnou roli během pohlavního vývoje a je zásadní pro zahájení pohlavního rozmnožování. Funkce související s pohlavním rozmnožováním a funkce vegetativní inkompatibility jsou řízeny odlišnými mechanismy (Saupe *et al.* 1996b).

Mating-type lokus existuje ve formách *mat-a* a *mat-A*. Tyto dvě formy se výrazně liší v sekvenci a funkci a jsou nazývány jako idiomorfy (Metzenberg a Glass 1990; Glass *et al.* 1990). Idiomorfa *mat-a* existuje jen jako jeden gen *mat-a1* (Staben a Yanofsky 1990). Idiomorfa *mat-A* obsahuje tři geny: *mat-A1*, *mat-A2* a *mat-A3* (Ferreira *et al.* 1996; Ferreira *et al.* 1998). Pro vegetativní inkompatibilitu jsou důležité geny *mat-a1* a *mat-A1*, kódující proteiny MAT-a1 (obsahuje HMG box doménu) a MAT-A1 (obsahuje  $\alpha$ -box doménu) (Coppin *et al.* 1997). Oba proteiny jsou transkripční faktory s DNA vazebnou doménou. Během pohlavního rozmnožování dochází k produkci specifických feromonů, k přesunu samčího jádra do askogonia a k dělení haploidních jader. Funkcí *mat* genů je kontrolovat, jestli jde o jádra jedinců opačného párovacího typu (tzn. jestli jde o jedince, kteří se liší alelami lokusu *mat*). Pohlavně kompatibilní jedinci jsou vegetativně nekompatibilní, tudíž koexprese opačných párovacích typů (alel *mat-a1* a *mat-A1*) během vegetativního růstu vede ke smrti heterokaryotické buňky (Saupe 2000), při pohlavním procesu je tomu ale naopak.

Pro proces buněčné smrti je v reakci vegetativní inkompatibility nezbytný gen *tol* (odvozeno z anglického „tolerant“), který kóduje polypeptid o velikosti 1011 aminokyselin obsahující coiled-coil (svinutá cívka) doménu a další doménu s vysokým počtem leucinových repeticí. Obě tyto struktury jsou důležité při protein-proteinových interakcích (Shiu a Glass 1999). Shiu a Glass (1999) zjistili, že proteiny MAT-a1 a MAT-A1 nejsou potřebné pro expresi či represi genu *tol*, ale že vznikne proteinový komplex MAT-a1/MAT-A1, který přímo interaguje s proteinem TOL, což vede k inkompatibilitě. Během pohlavního cyklu je potlačena exprese *tol*, aby mohlo dojít ke splynutí jedinců s opačným párovacím typem. Mutace v genu *tol* potlačují vegetativní inkompatibilitu, ale nemají efekt na pohlavní vývoj (Newmeyer 1970). Význam vegetativní inkompatibility zprostředkované mating-type lokusem může být například zamezení tvorby heterokaryotické buňky mezi opačně laděnými sourozenci, čímž se podporuje páření mezi nepříbuznými jedinci (outbreeding) (Shiu a Glass, 1999).



Podobně jako u genem *het-c* mediované vegetativní inkompatibility, mutace v lokusu *vib-1* potlačují vegetativní inkompatibilitu spojenou s *mat* lokusy (Obr. 5). *tol* je vůči *vib-1* epistatický (potlačuje jeho projevy). TOL může přenést signál spojený s *mat* vegetativní inkompatibilitou na transkripční faktor VIB-1, který potlačuje růst a sporulaci a navozuje kompartmentaci hyf a buněčnou smrt (Xiang a Glass 2004).

## 4. Vegetativní inkompatibilita u *Podospora anserina*

U *P. anserina* bylo celkem popsáno devět *het* lokusů. Pět z nich (*het-c*, *het-e*, *het-d*, *het-r* a *het-v*) je zahrnuto v nealelických interakcích, které tvoří tři systémy vegetativní inkompatibility (*het-c/het-d*, *het-c/het-e* a *het-r/het-v*). Alelický systém vegetativní inkompatibility u *P. anserina* tvoří alely *het-s/het-S* lokusu *het-s* (Pinan-Lucarré *et al.* 2007).

### 4.1. Alelický systém *het-s/het-S*

Systémy vegetativní inkompatibility ne vždy zahrnují protein s HET doménou. Takovým lokusem je např. *het-s* u *P. anserina*, který kóduje protein s vlastnostmi prionu (Coustou *et al.* 1997). Priony jsou infekční proteiny, které jsou schopné se šířit a vnucovat svoji konformaci jiným proteinům (Prusiner 1982). *het-s* lokus existuje ve dvou alelických formách a patří mezi alelické systémy vegetativní inkompatibility. K procesu vegetativní inkompatibility dochází, když ve stejné cytoplazmě dojde ke koexpresi dvou odlišných alel *het-s* a *het-S* (Tabulka 1). Homologické proteiny HET-s a HET-S, které jsou kódované alelami *het-s* a *het-S*, jsou složené z 289 aminokyselin a liší se pouze 13 aminokyselinami. Exprese těchto proteinů je zásadní pro zprostředkování vegetativní inkompatibility, ale pro jiné buněčné funkce důležité nejsou (Turcq *et al.* 1991). Oba proteiny jsou složeny ze dvou domén, N-konce se složenou  $\alpha$ -helikální HeLo doménou a C-koncové nesložené PFD domény (z anglického „prion forming domain“).

U kmenů s alelou *het-s* rozlišujeme dva odlišné fenotypy. Prvním je prionový, agregovaný a reaktivní fenotyp, který se značí [Het-s] a kóduje protein HET-s, který může vytvořit komplex s proteinem HET-S a vyvolat reakci vegetativní inkompatibility. Druhým fenotypem je tzv. rozpustný, nereaktivní fenotyp, který se značí [Het-s\*] a kóduje protein HET-s\*, který vegetativní inkompatibilitu při interakci s proteinem HET-S nevyvolává (Obr. 7). Rozdílnou reaktivitu těchto dvou fenotypů nezpůsobuje rozdílná exprese jimi

kódovaných proteinů, ale post-translační úpravy polypeptidu HET-s a HET-s\*. Tyto proteiny se liší i citlivostí k proteináze K; HET-s je vůči proteináze K více rezistentní (Coustou *et al.* 1997).

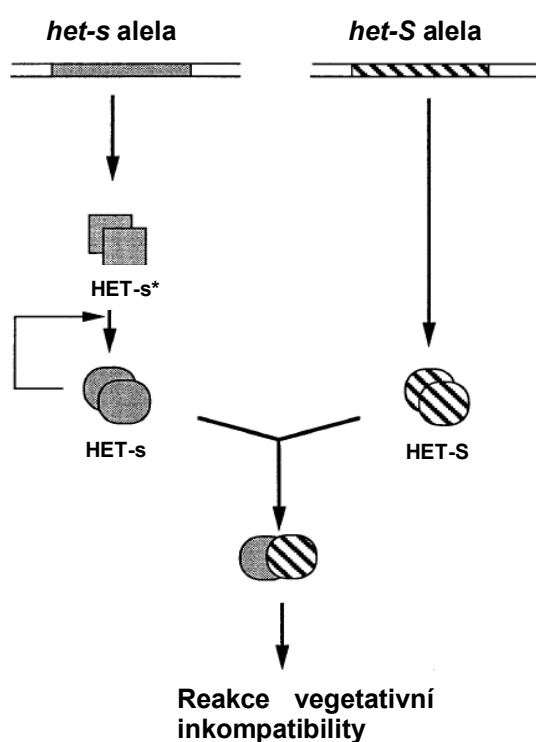
**Tabulka 1.** Nomenklatura lokusu *het-s*

<i>het-s</i>	lokus <i>het-s</i> ; alela <i>het-s</i>
<i>het-S</i>	alela <i>het-S</i>
HET-s	reaktivní prionový protein kódovaný <i>het-s</i>
HET-s*	nereaktivní protein kódovaný <i>het-s</i>
HET-S	protein kódovaný <i>het-S</i>
[Het-s]	fenotyp prionové reaktivní formy <i>het-s</i>
[Het-s*]	fenotyp nereaktivní formy <i>het-s</i>

Fenotyp [Het-s] se může šířit v kmenech [Het-s \*] jako infekční agens, což vede k přechodu fenotypu [Het-s \*] na prionový [Het-s]. Tento přechod je způsoben schopností prionového proteinu HET-s šířit se a vyvolat konformační změnu formy proteinu HET-s\* na formu HET-s. Tato konformační změna se může odehrávat i spontánně, a frekvence tohoto spontánního přechodu se zvyšuje s rostoucí mírou exprese genu *het-s* (Coustou *et al.* 1997). Konverze proteinu HET-s\* na formu HET-s je způsobena skládáním C-koncové PFD domény HET-s\* do  $\beta$ -solenoidové formy s trojúhelníkovým hydrofobním jádrem (Balguerie *et al.* 2003; Greenwald *et al.* 2010). Konverze se velmi rychle šíří z místa anastomózy po celém myceliu, čemuž napomáhá cenotická struktura mycelia u *P. anserina* (Coustou *et al.* 1997). Buněčná smrt při reakci vegetativní inkompatibility spočívá ve složení C-koncové domény proteinu HET-S na  $\beta$ -solenoidovou formu, což vyvolá konformační změnu N-koncové HeLo domény proteinu HET-S, která způsobí přesunutí proteinu HET-S z cytoplazmy do cytoplazmatické membrány. Tam působí jako toxin tvořící pór, čímž dojde k destabilizaci membrány a buněčné smrti (Seuring *et al.* 2012).

V genomu *P. anserina* byl objeven gen sousedící s *het-S*, který kóduje Nod-like receptor (z anglického „nucleotide oligomerization domain“). Tyto evolučně konzervované receptory hrají roli v časně imunitní odpovědi na patogenní invazi (Mahla *et al.* 2013)) a patří do rodiny STAND (proteiny, které zajišťují interakci GTP vazebného místa s dalšími proteinovými doménami zahrnutými v procesu programované buněčné smrti (Leipe *et al.* 2004)) (Danot *et al.* 2009). Protein, který kóduje, se označuje NWD2 a jeho N-koncová část je homologická s motivem PFD domény u HET-s. NWD2 a HET-S mohou být funkčně spjatý. Po aktivaci ligandem dojde v proteinu NWD2 ke konformační změně v jeho N-

koncové části na  $\beta$ -solenoidovou strukturu, která vyvolá sbalování PFD domény HET-S a následnou konformační změnu jeho HeLo domény, která vytvoří pór v membráně, jak bylo popsáno výše (Daskalov a Saupe 2015).



**Obr. 7.** Schéma vztahů mezi proteiny kódovanými lokusem *het-s*. Alela *het-S* kóduje protein HET-S. Alela *het-s* kóduje protein, který může existovat ve dvou formách. První formou je protein HET-s\*, který při vytvoření komplexu s proteinem HET-S reakci vegetativní inkompatibility nevyvolává, a druhou formou je prionový reaktivní protein HET-s, který po vytvoření komplexu s proteinem HET-S reakci vegetativní inkompatibility vyvolává. Protein HET-s může vyvolat konverzi proteinu HET-s\* na prionovou formu HET-s. Převzato a upraveno podle Coustou *et al.* (1997).

## 4.2. Nealelické systémy

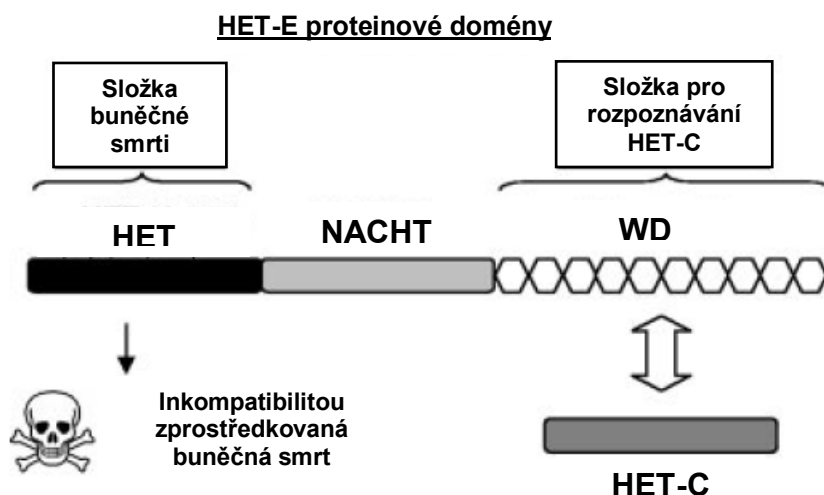
Mezi nealelické systémy *P. anserina* patří systémy *het-c/het-e*, *het-c/het-d* a *het-r/het-v*. Jak již bylo zmíněno výše, jedná se o interakce alel dvou odlišných lokusů. Při vhodných kříženích u těchto systémů bude potomstvo vykazovat takzvaný SI (z anglického „self-incompatible“) fenotyp. Tito potomci v jádře nesou nekompatibilní alely jmenovaných lokusů, a po vyklíčení askospor dojde po několika hodinách k zastavení růstu a programované buněčné smrti (Pinan-Lucarré *et al.* 2007). Jde tedy o jakousi formu post-zygotické reprodukční bariéry, což je zajímavé, protože vegetativní inkompatibilita funguje primárně jako pre-zygotická reprodukční bariéra. Nealelické systémy vegetativní inkompatibility u *P. anserina* se tedy zároveň chovají jako systémy pohlavní nekompatibility a je možné, že *het* geny mohou hrát roli při speciaci (Saupe 2000).

#### 4.2.1. *het-c/het-e* a *het-c/het-d* systém

Lokus *het-c* je u *P. anserina* zahrnut ve dvou nealelických systémech vegetativní inkompatibility, a to sice *het-c/het-e* a *het-c/het-d* (Pinan-Lucarré *et al.* 2007). *het-c* existuje v několika alelických formách, jejichž interakce s alelami lokusů *het-e* a *het-d* může vést k vegetativní inkompatibilitě. Při programované buněčné smrti zprostředkované interakcemi alel těchto lokusů je pozorovatelné zvětšení a prasknutí vakuol a indukce autofágie (Pinan-Lucarré *et al.* 2003). *het-c* kóduje protein zprostředkovávající transport glykolipidů (glycolipid transfer protein). Mutace v *het-c* způsobuje narušení větvení hyf a produkci abnormálních askospor, což podporuje hypotézu, že geny vegetativní inkompatibility mohly vzniknout genetickou divergencí genů s jinými funkcemi, než je vegetativní inkompatibilita (Saupe *et al.* 1994).

Geny *het-e* a *het-d* u *P. anserina* jsou homologické a patří do genové rodiny HNWD (geny s N-koncovou HET doménou, centrální NACHT doménou s GTP vazebným místem a C-koncovou WD40 repetitivní doménou). Počet WD repetice se liší mezi jednotlivými zástupci HNWD genové rodiny (Saupe *et al.* 1995; Paoletti *et al.* 2007). WD doména je proteinová doména regulující několik buněčných funkcí (např. přenosy signálů, zpracování RNA, sestavení cytoskeletu atp). Skládá se z několika opakujících se jednotek končících obvykle aminokyselinami tryptofanem a asparagovou kyselinou (Neer *et al.* 1994). Proteiny s NACHT doménou patří do třídy proteinů STAND. Pro navození vegetativní inkompatibility je u *het-e* nutná přítomnost minimálně deseti WD40 repeticí (Espagne *et al.* 1997) a u *het-d* alespoň jedenácti WD40 repeticí (Espagne *et al.* 2002). Polymorfismus u alel *het-e* a *het-d* leží v oblasti WD repetitivní domény a tato oblast je zodpovědná za rozpoznání nekompatibilního jedince při interakcích s *het-c* (Espagne *et al.* 2002).

Rozpoznání odlišného jedince v reakci vegetativní inkompatibility je u systémů *het-c/het-e* a *het-c/het-d* způsobeno interakcí proteinu HET-C spolu s WD40 repetitivní doménou proteinů HET-E a HET-D, přičemž HET doména těchto proteinů dále zprostředkuje buněčnou smrt (Obr. 8). Během vegetativního růstu je HET doména proteinů HET-E nebo HET-D inhibována navázáním vlastní domény NACHT nebo WD. Navázáním proteinu HET-C na WD doménu HET-E nebo HET-D dojde k aktivaci HET domény, která zprostředkuje programovanou buněčnou smrt buňky (Paoletti a Clavé 2007).



**Obr. 8.** Schéma systému *het-c/het-e* vegetativní inkompatibility. Složka pro vzájemné rozpoznání je tvořena WD repetitivní doménou proteinu HET-E, která je schopna při dostatečném množství repetice interagovat s proteinem HET-C nekompatibilního jedince. Složka zprostředkující buněčnou smrt je tvořena HET doménou, která je neaktivní do doby, než dojde k navázání proteinu HET-C na WD doménu. Převzato a upraveno podle Paoletti a Clavé (2007).

#### 4.2.2. *het-r/het-v* systém

Další systém vegetativní inkompatibility u *P. anserina* je *het-r/het-v* systém. Oba lokusy (*het-r* a *het-v*) existují ve dvou alelických formách (*het-r* a *het-R*; *het-V* a *het-VI*). Vegetativní inkompatibilitu u tohoto systému způsobují alelické interakce mezi *het-V* a *het-VI* a nealelické interakce mezi *het-V* a *het-R* (Pinan-Lucarré *et al.* 2007). *het-r* je členem genové rodiny HNWD a je homologický s geny *het-e* a *het-d*. Jak již bylo zmíněno výše, zástupci této genové rodiny mají N-koncovou HET doménu, centrální NACHT doménu s GTP vazebným místem a C-koncovou WD repetitivní doménu (Paoletti *et al.* 2007). Tak jako u alel genů *het-e* a *het-d* u *P. anserina*, rozdíl mezi jednotlivými alelami *het-r* a *het-R* je určen oblastí WD40 repetitivní domény. *het-v* zatím nebyl blíže charakterizován (Chevanne *et al.* 2009).

Kmeny nesoucí kombinaci alel *het-R* a *het-V* v jádře jsou vhodným modelem pro zkoumání procesů spojených s programovanou buněčnou smrtí, protože její navození je u těchto jedinců teplotně závislé. Při vystavení těchto kmenů nepříznivým teplotním podmínkám se projeví SI fenotyp a dojde k buněčné smrti, která se rozšiřuje do dalších buněk (Pinan-Lucarré *et al.* 2007). S reakcí vegetativní inkompatibility u těchto kmenů je spojeno zastavení syntézy RNA (Labarere *et al.* 1974), proteolytická a enzymatická aktivita

(Begueret 1972; Boucherie a Bernet 1978) a další změny v transkripci řady proteinů (Boucherie *et al.* 1981).

#### 4.2.3. Role genů *idi* a *mod* v systémech vegetativní inkompatibility

Geny *idi* (z anglického „induced during incompatibility“) jsou geny, jejichž exprese je indukována v průběhu vegetativní inkompatibility u *het-r/het-v* a *het-c/het-e* systémů u *P. anserina*. Dosud bylo charakterizováno šest *idi* genů (*idi-1*, *idi-2*, *idi-3*, *idi-4*, *idi-6*, *idi-7*), jejichž exprese není indukována jen při vegetativní inkompatibilitě, ale i v případě nedostatku živin či během vystavení účinkům antibiotika rapamycinu (Dementhon *et al.* 2003). Geny *idi-1*, *idi-2* a *idi-3* kódují malé proteiny se signálními peptidy nacházející se v buněčné stěně (Bourges *et al.* 1998; Dementhon *et al.* 2003). Geny *idi-1* a *idi-2* jsou exprimovány i při vegetativní inkompatibilitě u *het-c/het-e* SI kmenů (Bourges *et al.* 1998). Gen *idi-4* kóduje transkripční faktor bZIP a jeho zvýšená exprese během vegetativní inkompatibility vede k buněčné smrti. Kromě funkce zprostředkování buněčné smrti je *idi-4* důležitý pro expresi jiných *idi* genů (Dementhon *et al.* 2004). Geny *idi-6* a *idi-7* jsou oba zahrnuty v procesu autofágie. *idi-6* kóduje homolog kvasinkové vakuolární proteázy (Paoletti *et al.* 2001) a *idi-7* kóduje homolog proteinu AUT7 u *Saccharomyces cerevisiae* (Pinan-Lucarré *et al.* 2003).

Geny *mod-A*, *mod-B* a *mod-C* (z anglického „modifier“) jsou geny, jejichž mutace může potlačit vegetativní inkompatibilitu u SI kmenů. *mod-A* kóduje polypeptid s C-koncem bohatým na prolin, který je klíčový pro zastavení růstu během vegetativní inkompatibility a pro vývoj protoperithecií. Mutace v tomto genu způsobuje defekty fertility a jen částečné potlačení vegetativní inkompatibility tím, že zabrání zastavení růstu při inkompatibilitě (Barreau *et al.* 1998). Mutace v genu *mod-B* nemá žádný fenotypový projev při reakci vegetativní inkompatibility, ovšem pokud je vyražena funkce genů *mod-A* i *mod-B* současně, je kompletně potlačena reakce vegetativní inkompatibility. Tato kombinace také způsobuje samičí sterilitu u všech tří nealelických systémů *P. anserina* (Loubradou a Turcq 2000; Saupe 2000). Mutace v genu *mod-C* narušuje vegetativní inkompatibilitu pouze u SI kmenů systému *het-r/het-v* *P. anserina* (Labarere a Bernet 1977). Kromě výše zmíněných *mod* genů byly popsány ještě další, jejichž mutace může potlačovat inkompatibilitu u nealelických systémů *P. anserina* (např. *mod-D* a *mod-E*), nicméně tyto mutace byly objeveny

v komplexním genetickém kontextu a ne jako přímé supresory vegetativní inkompatibility (Saupe 2000).

## 5. Vegetativní inkompatibilita u *Cryphonectria parasitica*

Jak již bylo zmíněno výše, vegetativní inkompatibilita může fungovat jako mechanismus zabraňující přenosu mykovirů. Mykoviry mohou být u hub přenášeny dvěma způsoby. Jedním z nich je šíření skrze nepohlavní spory a druhým způsobem je cytoplasmatická výměna při anastomóze hyf. V druhém případě může tvorba sept a proces programované buněčné smrti vyvolaný reakcí vegetativní inkompatibility omezit horizontální šíření mykovirů (Nuss 2005). V důsledku infekce virem mohou mít patogenní houby sníženou schopnost vyvolat onemocnění u jejich hostitele. Tato snížená schopnost vyvolat onemocnění se nazývá hypovirulence a dá se využít pro biologickou kontrolu například u houby *C. parasitica*, která způsobuje korovou nekrózu kaštanovníků (Van Alfen *et al.* 1975; Nuss 2005). Zhang a Nuss (2016) vytvořili kmen *C. parasitica*, kterému vyřadili z funkce veškeré lokusy vegetativní inkompatibility. Takový kmen je dále využíván jako nástroj pro biokontrolu, jelikož funguje jako donor hypovirulentních mykovirů v populacích tohoto fytopatogena.

To, že vegetativní inkompatibilita omezuje přenos virů, bylo pozorováno také u *Ophiostoma ulmi* (Brasier 1988) a *Aspergillus niger* (a u dalších druhů takzvaných „černých aspergillů“ ze sekce *Nigri*) (Van Diepeningen *et al.* 1997).

### 5.1. *vic* geny

U *C. parasitica* bylo objeveno šest *vic* lokusů (*vic1*, *vic2*, *vic3*, *vic4*, *vic6* a *vic7*) (Cortesi a Milgroom 1998) a každý z těchto lokusů se vyskytuje ve dvou až pěti alelických formách. Při splynutí hyf dvou kmenů *C. parasitica* s nekompatibilní kombinací *vic* alel dochází k vakuolizaci, granulaci a kondenzaci cytoplazmy a programované buněčné smrti. Jednotlivé *vic* lokusy *C. parasitica* byly blíže charakterizovány na molekulární úrovni. Názvy těchto lokusů a jimi kódovaných proteinů jsou uvedeny v tabulce 2.

Analýza lokusu *vic6* odhalila, že jde o genový komplex dvou blízce vázaných genů *vic6* a *pix6* (odvozeno z anglického „partner with *vic* six“). Oba tyto geny existují ve dvou alelických formách *vic6-1*, *vic6-2* a *pix6-1* a *pix6-2*. K vegetativní inkompatibilitě a

souvisejícímu zamezení přenosu virů u lokusu *vic6* jsou zásadní nealelické interakce mezi *pix6-1/vic6-2* a *pix6-2/vic6-1*. Samotné alelické interakce mezi *vic6-1/vic6-2* a *pix6-1/pix6-2* nestačí pro vytvoření „barrage“ a navození inkompatibility.

Přítomnost viru může měnit frekvenci programované buněčné smrti vyvolané inkompatibilitou u *C. parasitica*. Tyto změny závisí na specifických interakcích mezi patogenem a hostitelem. Virus může potlačit reakci inkompatibility a snížit tak frekvenci programované buněčné smrti za účelem vlastního šíření. Nebo se naopak v reakci na přítomnost viru frekvence programované buněčné smrti zvýší, což podporuje hypotézu, že programovaná buněčná smrt zprostředkovaná hostitelem funguje u hub jako mechanismus, kterým se mohou bránit proti virům (Biella *et al.* 2002). Cortesi *et al.* (2001) zkoumali u všech šesti *vic* lokusů efekt jejich alel na přenos viru a zjistili, že přenos viru se významně liší mezi jednotlivými heteroalelickými lokusy. Heteroalelismus u lokusu *vic4* neměl žádný vliv na přenos viru. U lokusu *vic2* bylo zaznamenáno výrazné omezení přenosu viru v souvislosti s inkompatibilitou a heteroalelismem *vic2*. Heteroalelismus u lokusů *vic3* a *vic6* měl také vliv na omezení přenosu viru, ale nebyl tak výrazný jako u lokusu *vic2*, kde k přenosu došlo jen u 21 % případů. U lokusů *vic1* a *vic7* se přenos viru výrazně lišil podle toho, která z alel těchto lokusů byla přítomna v kmenu donora viru a která v kmenu recipienta, z čehož vyplývá, že přenos viru může být v souvislosti s heteroalelismem *vic* lokusů výrazně asymetrický. Podobné výsledky zaznamenali i Choi *et al.* (2012). V některých případech došlo ke zformování linie („barrage“) mezi kmeny donora a recipienta, ale přenosu viru nebylo zamezeno. Taková situace může nastat, když po splynutí hyf dvou jedinců dojde ke zpoždění či narušení procesu programované buněčné smrti a virus tím pádem získá čas na to, aby se rozšířil do sousedních buněk a celého mycelia (Biella *et al.* 2002).



**Tabulka 2.** Přehled genů spojených s vegetativní inkompatibilitou u tří modelových organismů

Zástupci	Označení lokusu (označení jeho alel)	Proteiny kódované geny vegetativní inkompatibility	Funkce kromě vegetativní inkompatibility	Zdroje
<i>Neurospora crassa</i>	<i>het-c</i> ( <i>het-c<sup>OR</sup></i> ; <i>het-c<sup>PA</sup></i> ; <i>het-c<sup>GR</sup></i> )	Protein plazmatické membrány složený ze dvou transmembránových domén		Sarkar <i>et al.</i> (2002)
	<i>pin-c</i> ( <i>pin-c1</i> ; <i>pin-c2</i> ; <i>pin-c3</i> )	Protein s HET doménou		Kaneko <i>et al.</i> (2006)
	<i>mat</i> ( <i>mat a-1</i> )  ( <i>mat A-1</i> )	Transkripční faktor; HMG box Transkripční faktor; $\alpha$ -box	Vstup do pohlavní fáze, exprese specifických feromonů	Shiu a Glass (2000)
	<i>tol</i>	Protein s HET doménou	Suprese vegetativní inkompatibility	Shiu a Glass (1999)
	<i>het-6</i> ( <i>het-6<sup>OR</sup></i> ; <i>het-6<sup>PA</sup></i> )	Protein s HET doménou		Smith <i>et al.</i> (2000)
	<i>vib-1</i>	Transkripční faktor	Suprese vegetativní inkompatibility, regulace sporulace a růstu, regulace transkripce a produkce extracelulárních proteáz	Dementhon <i>et al.</i> (2006)
	<i>un-24</i> ( <i>un-24<sup>OR</sup></i> a <i>un-24<sup>PA</sup></i> )	Velká podjednotka ribonukleotid-reduktázy	Syntéza a oprava DNA	Smith <i>et al.</i> (2000)
<i>Podospora anserina</i>	<i>het-c</i>	Glykolipid-transferový protein	Růst a produkce askospor	Saupe <i>et al.</i> (1994)
	<i>het-e</i>	Protein s N-koncovou HET doménou, centrální NACHT doménou a C-koncovou WD repetitivní doménou		Paoletti <i>et al.</i> (2007)
	<i>het-d</i>	Protein s N-koncovou HET doménou, centrální NACHT doménou a C-koncovou WD repetitivní doménou		Paoletti <i>et al.</i> (2007)
	<i>het-r</i> ( <i>het-r</i> ; <i>het-R</i> )	Protein s N-koncovou HET doménou, centrální NACHT doménou a C-koncovou WD repetitivní doménou		Chevanne <i>et al.</i> (2009)

	<i>het-v (het-V; het-V1)</i>	neznámé		Chevanne <i>et al.</i> (2009)
	<i>het-s (het-s; het-S)</i>	Protein s HeLo doménou a PFD doménou		Daskalov a Saupe (2015)
	<i>idi-1; idi-2; idi-3</i>	Malé proteiny se signálními peptidy		Bourges <i>et al.</i> (1998)
	<i>idi-4</i>	bZIP transkripční faktor	Transkripční regulátor jiných <i>idi</i> genů	Dementhon <i>et al.</i> (2004)
	<i>idi-6</i>	Homolog kvasinkové vakuolární proteázy	Likvidace autofagických tělísek	Paoletti <i>et al.</i> (2001)
	<i>idi-7</i>	Homolog AUT7 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Formace autofagozomů při autofágii	Pinan-Lucarré <i>et al.</i> (2003)
<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>vic1 (vic1a-1; vic1a-2) (vic1b-2)</i>  <i>(vic1c-1)</i>  <i>(vic1d-1)</i>	Protein s HET doménou Protein s DUF („domain of unknown function“) doménou LTR („long terminal repeat“) retrotranspozon Protein s HET doménou	Zamezení horizontálnímu šíření virů	Zhang <i>et al.</i> (2014)
	<i>vic2 (vic2-1; vic2-2) (vic2a-1; vic2a-2)</i>	Patatin-like protein sec-9-like SNARE protein	Zamezení horizontálnímu šíření virů	Choi <i>et al.</i> (2012)
	<i>vic3 (vic3a)</i>  <i>(vic3b)</i>	Hypotetický protein (protein, jehož existence nebyla experimentálně prokázána) Life-guard-like protein	Zamezení horizontálnímu šíření virů	Zhang <i>et al.</i> (2014)
	<i>vic4 (vic4-1)</i>  <i>(vic4-2)</i>	Protein s doménou podobnou protein-kináze c Protein s NACHT a WD repetitivní doménou		Choi <i>et al.</i> (2012)
	<i>vic6 (vic6-1; vic6-2)</i>	Protein s HET doménou	Zamezení horizontálnímu šíření virů	Choi <i>et al.</i> (2012)
	<i>pix6 (pix6-1; pix6-2)</i>	Protein s DUF doménou		Choi <i>et al.</i> (2012)
	<i>vic7 (vic7-1; vic7-2)</i>	Protein s HET doménou	Zamezení horizontálnímu šíření virů	Choi <i>et al.</i> (2012)

## 6. Závěr

Tato práce shrnuje dosud známé poznatky o významu vegetativní inkompatibility u vláknitých vřeckovýtrusých hub a o molekulárních mechanismech, kterými je tento proces zajištěn. Vegetativní inkompatibilita je proces vyskytující se u většiny druhů hub, ale na molekulární úrovni byl podrobně objasněn a popsán zatím jen u několika druhů askomycetů, konkrétně u *N. crassa*, *P. anserina* a *C. parasitica*. U dalších zástupců hub byly sice objeveny homology genů vegetativní inkompatibility (např. u *A. nidulans* bylo popsáno osm *het* genů (Anwar *et al.* 1993)), ale zatím nebyly tyto geny a s nimi spojené molekulární mechanismy blíže charakterizovány. Vzhledem k tomu, že se mechanismy vegetativní inkompatibility mezi druhy poměrně liší, by do budoucna bylo vhodné rozšířit spektrum druhů, u kterých se geny vegetativní inkompatibility zkoumají.

Vegetativní inkompatibilitu mohou navodit interakce alelické, tj. interakce geneticky nekompatibilních alel jednoho genu (např. alely lokusu *het-s* u *P. anserina*), nebo interakce nealelické, kdy je inkompatibilita způsobena interakcemi geneticky nekompatibilních alel dvou odlišných blízce vázaných genů (např. genů *het-c* a *pin-c* u *N. crassa*) nebo dvou odlišných genů, které nejsou blízce vázány (např. geny *het-c* a *het-e* u *P. anserina*). Výsledkem je ale vždy velmi podobná, evolučně konzervovaná reakce, zakončená buněčnou smrtí heterokaryotické buňky.

K rozpoznávání kompatibilních či nekompatibilních alelických kombinací mezi jedinci dochází díky proteinovým interakcím vysoce polymorfních alel genů vegetativní inkompatibility (např. genů *het*, *vic* a dalších). Buněčná smrt bývá při nekompatibilní kombinaci alel většinou zprostředkována proteiny s HET doménou, jejichž přítomnost bývá v systémech vegetativní inkompatibility častá, nicméně existují i systémy vegetativní inkompatibility, u kterých přítomen není (např. u lokusu *het-s* *P. anserina*). Genů kódujících protein s HET doménou je v genomech askomycetů mnoho. Zatím byla prozkoumána jen část objevených proteinů s HET doménou a některým byla připsána funkce kontroly vegetativní inkompatibility. Je pravděpodobné, že budoucí studie odhalí další takové geny zapojené v procesu vegetativní inkompatibility.

Vegetativní inkompatibilita funguje jako mechanismus zachovávající genetickou individualitu jedince a může zabraňovat horizontálnímu šíření škodlivých cytoplazmatických elementů, například mykovirů. U fytopatogenních hub (např. u *C. parasitica*, původce korové nekrózy kaštanovníků) se tohoto poznatku dá využívat pro biologickou kontrolu. Geny zapojené v procesu vegetativní inkompatibility mohou mít i jiné

funkce, např. *mat* lokus u *N. crassa* funguje zároveň jako gen pohlavní inkompatibility a je zásadní pro pohlavní rozmnožování.

Geny pohlavní inkompatibility jsou v současné době intenzivně studovány, ale geny vegetativní inkompatibility byly zatím detailně prozkoumány pouze u malého počtu modelových organismů. Budoucí studie genů vegetativní inkompatibility by měly objasnit detailnější mechanismy jejich fungování při fúzi vegetativních hyf a jejich roli při mezidruhovém křížení a speciaci.

## 7. Seznam použité literatury

- Aanen, D. K., A. J. M. Debets, N. L. Glass, and S. J. Saupe. 2010. Biology and Genetics of Vegetative Incompatibility in Fungi. Pp. 274–88 in *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. American Society of Microbiology.
- Van Alfen, N. K., R. A. Jaynes, S. L. Anagnostakis, and P. R. Day. 1975. Chestnut Blight: Biological Control by Transmissible Hypovirulence in *Endothia parasitica*. *Science* 189(4206):890–91.
- Anwar, M. M., J. H. Croft, and R. B. G. Dales. 1993. Analysis of Heterokaryon Incompatibility between Heterokaryon-Compatibility (h-c) Groups R and GL Provides Evidence That at Least Eight *het* Loci Control Somatic Incompatibility in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 139(7):1599–1603.
- Balguerie, A., S. D. Reis, Â. Chaignepain, Ch. Ritter, K. Bathany, I. Lascu, J-M. Schmitter, R. Riek, and S. J. Saupe. 2003. Domain Organization and Structure  $\pm$  Function Relationship of the HET-s Prion Protein of *Podospora anserina*. *EMBO Journal* 22(9):2071–81.
- Barreau, Ch., M. Iskandar, G. Loubradou, V. Levallois, and J. Bégueret. 1998. The *mod-A* Suppressor of Nonallelic Heterokaryon Incompatibility in *Podospora anserina* Encodes a Proline-Rich Polypeptide Involved in Female Organ Formation. *Genetics* 149(2):915–26.
- Bastiaans, E., Alfons J. M. Debets, and D. K. Aanen. 2015. Experimental Demonstration of the Benefits of Somatic Fusion and the Consequences for Allorecognition. *Evolution* 69(4):1091–99.
- Begueret, J. 1972. Protoplasmic Incompatibility: Possible Involvement of Proteolytic Enzymes. *Nature New Biology* 235(54):56–58.
- Biella, S., M. L. Smith, J. R. Aist, P. Cortesi, and M. G. Milgroom. 2002. Programmed Cell Death Correlates with Virus Transmission in a Filamentous Fungus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269(1506):2269–76.
- Boucherie, H. and J. Bernet. 1978. Protoplasmic Incompatibility and Self-Lysis in *Podospora anserina* : Enzyme Activities Associated with Cell Destruction. *Canadian Journal of Botany* 56(17):2171–76.
- Boucherie, H., Ch. H. Dupont, and J. Bernet. 1981. Polypeptide Synthesis during Protoplasmic Incompatibility in the Fungus *Podospora anserina*. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis* 653(1):18–26.
- Bourges, N., A. Groppi, Ch. Barreau, C. Clavé, and J. Bégueret. 1998. Regulation of Gene Expression during the Vegetative Incompatibility Reaction in *Podospora anserina*: Characterization of Three Induced Genes. *Genetics* 150(2):633–41.
- Brasier, C. M. 1988. Rapid Changes in Genetic Structure of Epidemic Populations of *Ophiostoma ulmi*. *Nature* 332(6164):538–41.
- Brasier, C. M., S. A. Kirk, N. D. Pipe, and K. W. Buck. 1998. Rare Interspecific Hybrids in Natural Populations of the Dutch Elm Disease Pathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. *Mycological Research* 102(1):45–57.
- Caten, C. E. 1972. Vegetative Incompatibility and Cytoplasmic Infection in Fungi. *Journal of General Microbiology* 72(2):221–29.
- Chevanne, D., E. Bastiaans, A. Debets, S. J. Saupe, C. Clavé, and M. Paoletti. 2009. Identification of the *het-r* Vegetative Incompatibility Gene of *Podospora anserina* as a Member of the Fast Evolving HNWD Gene Family. *Current Genetics* 55(1):93–102.
- Choi, G. H., A. L. Dawe, A. Churbanov, M. L. Smith, M. G. Milgroom, and D. L. Nuss. 2012. Molecular Characterization of Vegetative Incompatibility Genes That Restrict

- Hypovirus Transmission in the Chestnut Blight Fungus *Cryphonectria Parasitica*. *Genetics* 190(1):113–27.
- Coppin, E., R. Debuchy, S. Arnaise, and M. Picard. 1997. Mating Types and Sexual Development in Filamentous Ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(4):411–28.
- Cortesi, P., Ch. E. McCulloch, H. Song, H. Lin, and M. G. Milgroom. 2001. Genetic Control of Horizontal Virus Transmission in the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* 159(1):107–18.
- Cortesi, P. and M. G. Milgroom. 1998. Genetics of Vegetative Incompatibility In *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(8):1–7.
- Coustou, V., C. Deleu, S. J. Saupe, and J. Bégueret. 1997. The Protein Product of the *het-s* Heterokaryon Incompatibility Gene of the Fungus *Podospora anserina* Behaves as a Prion Analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(18):9773–78.
- Danot, O., E. Marquenet, D. Vidal-Ingigliardi, and E. Richet. 2009. Wheel of Life, Wheel of Death: A Mechanistic Insight into Signaling by STAND Proteins. *Structure* 17(2):172–82.
- Daskalov, A. and S. J. Saupe. 2015. As a Toxin Dies a Prion Comes to Life: A Tentative Natural History of the [Het-s] Prion. *Prion* 9(3):184–89.
- Debets, A. J. M. and A. J. F. Griffiths. 1998. Polymorphism of *het*-Genes Prevents Resource Plundering in *Neurospora crassa*. *Mycological Research* 102(11):1343–49.
- Dementhon, K., G. Iyer, and N. L. Glass. 2006. VIB-1 Is Required for Expression of Genes Necessary for Programmed Cell Death in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 5(12):2161–73.
- Dementhon, K., M. Paoletti, B. Pinan-Lucarré, N. Loubradou-Bourges, M. Sabourin, S. J. Saupe, and C. Clavé. 2003. Rapamycin Mimics the Incompatibility Reaction in the Fungus *Podospora anserina*. *Eukaryotic Cell* 2(2):238–46.
- Dementhon, K., S. J. Saupe, and C. Clavé. 2004. Characterization of IDI-4, a BZIP Transcription Factor Inducing Autophagy and Cell in the Fungus *Podospora anserina*. *Molecular Microbiology* 53(6):1625–40.
- Dettman, J. R., D. J. Jacobson, and J. W. Taylor. 2003. A Multilocus Genealogical Approach to Phylogenetic Species Recognition in the Model Eukaryote *Neurospora*. *Evolution* 57(12):2703–20.
- Van Diepeningen, A. D., A. J. M. Debets, and R. F. Hoekstra. 1997. Heterokaryon Incompatibility Blocks Virus Transfer among Natural Isolates of Black Aspergilli. *Current Genetics* 32(3):209–17.
- Dyer, P. S. and C. M. O’Gorman. 2011. A Fungal Sexual Revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* Show the Way. *Current Opinion in Microbiology* 14(6):649–54.
- Espagne, E., P. Balhadère, J. Bégueret, and B. Turcq. 1997. Reactivity in Vegetative Incompatibility of the HET-E Protein of the Fungus *Podospora anserina* Is Dependent on GTP-Binding Activity and a WD40 Repeated Domain. *Molecular and General Genetics* 256(6):620–27.
- Espagne, E., P. Balhadère, M. L. Penin, Ch. Barreau, and B. Turcq. 2002. HET-E and HET-D Belong to a New Subfamily of WD40 Proteins Involved in Vegetative Incompatibility Specificity in the Fungus *Podospora anserina*. *Genetics* 161(1):71–81.
- Fedorova, N. D., J. H. Badger, G. D. Robson, J. R. Wortman, and W. C. Nierman. 2005. Comparative Analysis of Programmed Cell Death Pathways in Filamentous Fungi. *BMC Genomics* 6(1), 177.
- Ferreira, A. V. B., Z. An, R. L. Metzenberg, and N. L. Glass. 1998. Characterization of *mat A-2*, *mat A-3* and  $\Delta$ *matA* Mating-Type Mutants of *Neurospora Crassa*. *Genetics*

- 148(3):1069–79.
- Ferreira, A. V. B., S. J. Saupe, and N. L. Glass. 1996. Transcriptional Analysis of the *mt A* Idiomorph of *Neurospora Crassa* Identifies Two Genes in Addition to *mt A-1*. *Molecular and General Genetics* 250(6):767–74.
- Glass, N. L. and K. Dementhon. 2006. Non-Self Recognition and Programmed Cell Death in Filamentous Fungi. *Current Opinion in Microbiology* 9(6):553–58.
- Glass, N. L., J. Grotelueschen, and R. L. Metzenberg. 1990. *Neurospora crassa* A Mating-Type Region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(13):4912–16.
- Greenwald, J., C. Buhtz, Ch. Ritter, W. Kwiatkowski, S. Choe, M.-L. Maddelein, F. Ness, S. Cescau, A. Soragni, D. Leitz, S. J. Saupe, and R. Riek. 2010. The Mechanism of Prion Inhibition by HET-S. *Molecular Cell* 38(6):889–99.
- Hubka, V., V. Barrs, Z. Dudová, F. Sklenář, A. Kubátová, T. Matsuzawa, T. Yaguchi, Y. Horie, A. Nováková, J. C. Frisvad, J. J. Talbot, and M. Kolařík. 2018. Unravelling Species Boundaries in the *Aspergillus Viridinutans* Complex (Section *Fumigati*): Opportunistic Human and Animal Pathogens Capable of Interspecific Hybridization. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 41(1):142–74.
- Jones, E. Y., J. Tormo, S. W. Reid, and D. I. Stuart. 1998. Recognition Surfaces of MHC Class I. *Immunological Reviews* 163(1):121–28.
- Jordan, A. and P. Reichard. 1998. Ribonucleotide Reductases. *Annual Review of Biochemistry* 67:71–98.
- Kaneko, I., K. Dementhon, Q. Xiang, and N. L. Glass. 2006. Nonallelic Interactions between *het-c* and a Polymorphic Locus, *pin-c*, Are Essential for Nonself Recognition and Programmed Cell Death in *Neurospora crassa*. *Genetics* 172(3):1545–55.
- Klein, J., A. Sato, S. Nagl, and C. O’hUigín. 2002. Molecular Trans-Species Polymorphism. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29(1):1–21.
- Kwon-Chung, K. J. and J. A. Sugui. 2009. Sexual Reproduction in *Aspergillus* Species of Medical or Economical Importance: Why so Fastidious? *Trends in Microbiology* 17(11):481–87.
- Labarere, J., J. Bégueret, and J. Bernet. 1974. Incompatibility in *Podospira anserina*: Comparative Properties of the Antagonistic Cytoplasmic Factors of a Nonallelic System Downloaded From. *Journal of Bacteriology* 120(2):854–60.
- Labarere, J. and J. Bernet. 1977. Protoplasmic Incompatibility and Cell Lysis in *Podospira anserina*. I. Genetic Investigations on Mutations of a Novel Modifier Gene That Suppresses Cell Destruction. *Genetics* 87(2):249–57.
- Lafontaine, D. L. and M. L. Smith. 2012. Diverse Interactions Mediate Asymmetric Incompatibility by the *het-6* Supergene Complex in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 49(1):65–73.
- Leipe, D. D., E. V. Koonin, and L. Aravind. 2004. STAND, a Class of P-Loop NTPases Including Animal and Plant Regulators of Programmed Cell Death: Multiple, Complex Domain Architectures, Unusual Phyletic Patterns, and Evolution by Horizontal Gene Transfer. *Journal of Molecular Biology* 343(1):1–28.
- Loubradou, G. and B. Turcq. 2000. Vegetative Incompatibility in Filamentous Fungi: A Roundabout Way of Understanding the Phenomenon. *Research in Microbiology* 151(4):239–45.
- Mahla, R. S., M. C. Reddy, D. V. R. Prasad, and H. Kumar. 2013. Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology. *Frontiers in Immunology* 4(SEP).
- Metzenberg, R. L. and N. L. Glass. 1990. Mating Type and Mating Strategies in *Neurospora*. *BioEssays* 12(2):53–59.

- Micali, C. O. and M. L. Smith. 2006. A Nonself Recognition Gene Complex in *Neurospora crassa*. *Genetics* 173(4):1991–2004.
- Nasrallah, J. B. 2002. Recognition and Rejection of Self in Plant Reproduction A Variety of Plant SI Systems. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol* 296(April):305–9.
- Neer, E. J., C. J. Schmidt, R. Nambudripad, and T. F. Smith. 1994. The Ancient Regulatory-Protein Family of WD-Repeat Proteins. *Nature* 371(6495):297–300.
- Newmeyer, D. 1970. A Suppressor of the Heterokaryon-Incompatibility Associated With Mating Type in *Neurospora crassa*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 12(4):914–26.
- Nuss, D. L. 2005. Hypovirulence: Mycoviruses at the Fungal-Plant Interface. *Nature Reviews Microbiology* 3(8):632–42.
- Paoletti, M. and C. Clavé. 2007. The Fungus-Specific HET Domain Mediates Programmed Cell Death in *Podospora anserina*. *Society* 6(11):2001–8.
- Paoletti, M. 2016. Vegetative Incompatibility in Fungi: From Recognition to Cell Death, Whatever Does the Trick. *Fungal Biology Reviews* 30(4):152–62.
- Paoletti, M., M. Castroviejo, J. Bégueret, and C. Clavé. 2001. Identification and Characterization of a Gene Encoding a Subtilisin-like Serine Protease Induced during the Vegetative Incompatibility Reaction in *Podospora anserina*. *Current Genetics* 39(4):244–52.
- Paoletti, M., S. J. Saupe, and C. Clavé. 2007. Genesis of a Fungal Non-Self Recognition Repertoire. *PLoS ONE* 2(3):283.
- Pinan-Lucarré, B., M. Paoletti, and C. Clavé. 2007. Cell Death by Incompatibility in the Fungus *Podospora*. *Seminars in Cancer Biology* 17(2):101–11.
- Pinan-Lucarré, B., M. Paoletti, K. Dementhon, B. Coulary-Salin, and C. Clavé. 2003. Autophagy Is Induced during Cell Death by Incompatibility and Is Essential for Differentiation in the Filamentous Fungus *Podospora anserina*. *Molecular Microbiology* 47(2):321–33.
- Pontecorvo, G. 2003. The Parasexual Cycle in Fungi. *Annual Review of Microbiology* 10(1):393–400.
- Prusiner, S. B. 1982. Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science* 216(4542):136–44.
- Saenz, G. S., J. G. Stam, D. J. Jacobson, and D. O. Natvig. 2001. Heteroallelism at the *het-c* Locus Contributes to Sexual Dysfunction in Outcrossed Strains of *Neurospora tetrasperma*. *Fungal Genetics and Biology* 34(2):123–29.
- Sarkar, S., G. Iyer, J. Wu, and N. L. Glass. 2002. Nonself Recognition Is Mediated by HET-C Heterocomplex Formation during Vegetative Incompatibility. *EMBO Journal* 21(18):4841–50.
- Saupe, S. J., C. Descamps, B. Turcq, and J. Bégueret. 1994. Inactivation of the *Podospora anserina* Vegetative Incompatibility Locus *het-c*, Whose Product Resembles a Glycolipid Transfer Protein, Drastically Impairs Ascospore Production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(13):5927–31.
- Saupe, S. J. 2000. Molecular Genetics of Heterokaryon Incompatibility in Filamentous Ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 64(3):489–502.
- Saupe, S. J., C. Clavé, and J. Bégueret. 2000. Vegetative Incompatibility in Filamentous Fungi: *Podospora* and *Neurospora* Provide Some Clues. *Current Opinion in Microbiology* 3(6):608–12.
- Saupe, S. J. and N. L. Glass. 1997. Allelic Specificity at the *het-c* Heterokaryon Incompatibility Locus of *Neurospora crassa* Is Determined by a Highly Variable Domain. *Genetics* 146:1299–1309.
- Saupe, S. J., G. A. Kuldau, M. L. Smith, and N. L. Glass. 1996a. The Product of the *het-c*



- Heterokaryon Incompatibility Gene of *Neurospora crassa* Has Characteristics of a Glycine-Rich Cell Wall Protein. *Genetics* 143(4):1589–1600.
- Saupe, S. J., L. Stenberg, K. T. Shiu, A. J. F. Griffiths, and N. L. Glass. 1996b. The Molecular Nature of Mutations in the *mt A-1* Gene of the *Neurospora crassa* A Idiomorph and Their Relation to Mating-Type Function. *Molecular and General Genetics* 250(1):115–22.
- Saupe, S. J., B. Turcq, and J. Bégueret. 1995. A Gene Responsible for Vegetative Incompatibility in the Fungus *Podospira anserina* Encodes a Protein with a GTP-Binding Motif and G $\beta$  Homologous Domain. *Gene* 162(1):135–39.
- Seuring, C., J. Greenwald, Ch. Wasmer, R. Wepf, S. J. Saupe, B. H. Meier, and R. Riek. 2012. The Mechanism of Toxicity in HET-S/HET-s Prion Incompatibility. *PLoS Biology* 10(12):1001451.
- Shiu, P. K. T. and N. L. Glass. 2000. Cell and Nuclear Recognition Mechanisms Mediated by Mating Type in Filamentous Ascomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 3(2):183–88.
- Shiu, P. K. T. and N. L. Glass. 1999. Molecular Characterization of *tol*, a Mediator of Mating-Type-Associated Vegetative Incompatibility in *Neurospora crassa*. *Genetics* 151(2):545–55.
- Smith, M. L., O. C. Micali, S. P. Hubbard, N. Mir-Rashed, D. J. Jacobson, and N. L. Glass. 2000. Vegetative Incompatibility in the *het-6* Region of *Neurospora crassa* Is Mediated by Two Linked Genes. *Genetics* 155(3):1095–1104.
- Staben, Ch. and Ch. Yanofsky. 1990. *Neurospora crassa* a Mating-Type Region. *Genetics* 87:4917–21.
- Swilaiman, S. S., C. M. O’Gorman, S. A. Balajee, and P. S. Dyer. 2013. Discovery of a Sexual Cycle in *Aspergillus lentulus*, a Close Relative of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 12(7):962–69.
- Turcq, B., C. Deleu, M. Denayrolles, and J. Bégueret. 1991. Two Allelic Genes Responsible for Vegetative Incompatibility in the Fungus *Podospira anserina* Are Not Essential for Cell Viability. *MGG Molecular & General Genetics* 228(1–2):265–69.
- Turner, E., D. J. Jacobson, and J. W. Taylor. 2010. Reinforced Postmating Reproductive Isolation Barriers in *Neurospora*, an Ascomycete Microfungus. *Journal of Evolutionary Biology* 23(8):1642–56.
- Worrall, J. J. 2007. Somatic Incompatibility in Basidiomycetes. *Mycologia* 89(1):24.
- Wu, J., S. J. Saupe, and N. L. Glass. 2002. Evidence for Balancing Selection Operating at the *het-c* Heterokaryon Incompatibility Locus in a Group of Filamentous Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(21):12398–403.
- Xiang, Q. and N. L. Glass. 2002. Identification of *vib-1*, a Locus Involved in Vegetative Incompatibility Mediated by *het-c* in *Neurospora crassa*. *DNA Sequence* 101(September):89–101.
- Xiang, Q. and N. L. Glass. 2004. The Control of Mating Type Heterokaryon Incompatibility by *vib-1*, a Locus Involved in *het-c* Heterokaryon Incompatibility in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 41(12):1063–76.
- Zhang, D. X. and D. L. Nuss. 2016. Engineering Super Mycovirus Donor Strains of Chestnut Blight Fungus by Systematic Disruption of Multilocus *vic* Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(8):2062–67.
- Zhang, D. X., M. J. Spiering, A. L. Dawe, and D. L. Nuss. 2014. Vegetative Incompatibility Loci with Dedicated Roles in Allorecognition Restrict Mycovirus Transmission in Chestnut Blight Fungus. *Genetics* 197(2):701–14.